

Aus dem Hygiene-Institut
(Direktor: Professor Dr. H. Kliewe)
und der Klinik für Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten)
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Martin Herrmann)
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

LANGFRISTIGE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE STREPTOKOKKENFLORA DES RATTENSPEICHEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der hohen medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Klaus ~~S~~chmahl
Zahnarzt aus Mainz-Bretzenheim
Mainz 1960

Aus dem Hygiene-Institut
(Direktor: Professor Dr. H. Kliewe)
und der Klinik für Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten)
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Martin Herrmann)
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

LANGFRISTIGE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE STREPTOKOKKENFLORA DES RATTENSPEICHEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der hohen medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Klaus Schmahl
Zahnarzt aus Mainz-Bretzenheim
Mainz 1960

Dekan: Professor Dr. Dr. M. HERRMANN
Referent: Professor Dr. T. LAMMERS
Korreferent: Professor Dr. Dr. M. HERRMANN

Datum des Diploms 20. JULI 1960



Meinen Eltern

INHALT

- I. Einleitung
- II. Zusammenhänge zwischen Speichelflora und Karies beim Menschen
 - 1. Das Bild der Speichelflora bei karies-resistenten und kariesanfälligen Menschen
 - a) Die Speichelflora nach qualitativen Gesichtspunkten
 - b) Das quantitative bakteriologische Speichelbild
 - 2. Streptokokken und Zahnkaries
- III. Speichelflora und experimentelle Tierzahnkaries
- IV. Eigene Untersuchungen über die Streptokokken-flora des Rattenspeichels
 - 1. Untersuchungsmethodik
 - a) Tiermaterial
 - b) Speichelentnahme
 - c) Nährböden
 - d) Verarbeitung der Zahnabstriche
 - 2. Untersuchungsergebnisse
- V. Diskussion
- VI. Zusammenfassung
- VII. Literaturangaben

I. Einleitung

In jüngerer Zeit wird immer mehr die Speichelflora des Menschen zur Festlegung der momentanen Kariesdisposition herangezogen. So wurden eine Reihe von Karies-Tests entwickelt (SNYDER-Test, SL-Test u.a.), die entweder die Speichelbakterien selbst, oder deren Stoffwechselleistung als Kriterium der Kariesdisposition heranziehen.

Im Gegensatz zur Kariesforschung am Menschen haben derartige Tests in Tierversuchen noch keinen Eingang gefunden. Um überhaupt einmal eine Basis für die Beurteilung der Speichelflora des Versuchstieres und ihrer Zusammenhänge zur Tierkaries zu schaffen, haben wir über mehrere Generationen in regelmässigen Abständen die Speichelflora von Ratten des Versuchstierstalles der Universitäts-Zahnklinik in Mainz untersucht. Da der häufigste Speichelkeim auch bei der Ratte der Streptokokkus ist, haben wir uns dabei im wesentlichen auf die quantitative und qualitative Bestimmung der Streptokokkenflora beschränkt. Parallel dazu wurde die AcB-Flora von DÖHN (4) untersucht.

II. Zusammenhänge zwischen Speichelflora und Karies beim Menschen

Seitdem MILLER (17) 1889 die Karies als chemisch-parasitären Vorgang bezeichnete, fehlte es nicht an Versuchen, die ätiologische Bedeutung der Mundflora für die Karies zu klären. Schon im Jahre 1897 stellte WILLIAMS (31) fest, daß bei auffallendem Schmelzerfall Streptokokken alle anderen Mikroorganismen im Speichel an Zahl weit übertreffen. Spätere eingehende Untersuchungen ergaben nun die besondere Bedeutung jener Mikroorganismen, die bei der Fermentation von Kohlehydraten Gärungssäuren bilden, die zu einer erhöhten Löslichkeit des Ca-Phosphats als Hauptbestandteil der harten Zahnschubstanz führen. Es sind dies im wesentlichen Acidophilus-Bakterien (Lactobazillen), Hefen und Streptokokken.

Weitere Untersuchungen befaßten sich mit den quantitativen und qualitativen Unterschieden innerhalb der säurebildenden Bakterienflora zwischen kariesanfälligen und kariesresistenten Menschen.

1. Das Bild der Speichelflora bei kariesresistenten und kariesanfälligen Menschen

a) Die Speichelflora nach qualitativen Gesichtspunkten

Im Speichel des Mundgesunden sind hauptsächlich solche Keime vertreten, die ihr Optimum an Lebensfähigkeit im annähernd pH-neutralen Milieu finden. Das sind im wesentlichen Staphylokokken, GRAM-negative Mikrokokken, Sarcinen und vergrünende Streptokokken. Keime, deren Wachstumsoptimum mehr im alkalischen bzw. sauren Bereich liegt, wie Bakterien

der Coli-Gruppe, Sporenbildner und Proteusbakterien einerseits, Lactobazillen andererseits, treten im Speichel Mundgesunder überhaupt nicht oder nur in verschwindend kleiner Zahl auf (13, 18, 19, 20).

Auf der Schleimhaut Mundgesunder findet sich eine eintönige Besiedlung mit vergrünenden Streptokokken, die dem Epithel in typischer Diplo-Form aufliegen.

Im Zahnbelag (Plaque) finden sich Fadenbakterien, Streptokokken und gelegentlich Schraubenbakterien (*Spirochaeta dentium*) (5).

Bei hoher Kariesanfälligkeit ist das mikrobiologische Speichelbild regelmässig zur Seite der sauren Symbiose verschoben. Die Zahl der vergrünenden Streptokokken, Hefen und Lactobazillen liegt bei weitem über der der Staphylokokken, Sarcinen und GRAM-negativen Mikrokokken (11, 12).

Die Flora der Schleimhaut zeigt im wesentlichen das gleiche Bild wie die Schleimhaut Mundgesunder, während im Zahnbelag bei florider Karies regelmässig massenhaft Milchsäurestäbchen auftreten, die häufig in ein Netz von Fadenbakterien eingebettet sind (14).

b) Das mikrobiologische Speichelbild in quantitativer Hinsicht

Untersuchungen über die quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterienarten des menschlichen Speichels wurden u.a. von LAMMERS (15) und KLINGE (10) durchgeführt.

KLINGE fand, daß der Anteil der vergrünenden Streptokokken an der Gesamtflora bei kariesresistenten 20%, bei vorhandener Karies aber 40% beträgt.

Das Verhältnis von Staphylokokken : Streptokokken war beim Mundgesunden 2 : 1, bei Karies dagegen 1 : 3.

Nach LAMMERS ist das Verhältnis von Staphylokokken zu Streptokokken beim Mundgesunden 2 : 1, bei florider Karies aber 1 : 5.

Das Verhältnis von Lactobazillen zur Gesamtkeimzahl bezeichnet LAMMERS als AcB-Index, im Gegensatz zu HADLEY (7), der die Gesamtzahl der Lactobazillen pro ccm Speichel als AcB-Index bezeichnet hat.

Nach den Untersuchungen von LAMMERS pendelt der AcB-Index im Speichel Mundgesunder zwischen 10^{-3} und 10^{-4} , während er bei florider Karies stets über 10^{-2} liegt.

Sporenbildner, die einem alkalischen Milieu angepaßt sind, fanden sich bei Mundgesunden durchschnittlich 4%, während sie bei Karies nur in Ausnahmefällen nachweisbar waren.

2. Streptokokken und Zahnkaries

Wie wir bereits erwähnt haben, wird das Gros der Mundstreptokokken von den (im engeren Sinne) vergrünenden Streptokokken der "Viridans-Gruppe" gestellt. Hier dominieren vor allem der Str. salivarius und der Str. viridans seu mitis. Da die vergrünenden, nicht haemolysierenden Streptokokken kein Gruppenantigen besitzen und eine serologische Differenzierung im Gegensatz zu den haemolysierenden Streptokokken nicht möglich ist, ist es bisher nicht gelungen, zu einer befriedigenden Differenzierung und Systematik zu kommen. Durch die Uneinigkeit in der

Nomenklatur ist es heute kaum noch möglich, sich in den Begriffen wie *Str. salivarius*, *Str. viridans*, *Str. mitis* u.a. zurechtzufinden. Hier ein kurzer Überblick über die Entwicklung, die zu der heutigen Situation geführt hat:

SCHOTTMÜLLER (26) prägte 1903 den Namen *Str. mitior* seu *viridans*, und er verstand darunter die in Krankheitsprozessen (u.a. bei der Endocarditis lenta) allein oder in Gesellschaft anderer Keime aufgefundenen Streptokokken, die auf der von ihm angegebenen Blutplatte mit Vergrünung wuchsen und die im Gegensatz zu den meist hochvirulenten haemolysierenden Streptokokken nur eine geringe Virulenz im Tierversuch zeigten (lat. *mitior* = der Mildere).

ANDREWS und HORTER (1) (1906) unterteilten die in Rachen und Darm vorkommenden Streptokokken, die auf der Blutplatte ohne beta-Haemolyse wachsen, in vier Arten: *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. equinus* und *Str. faecalis*. Sie vertraten die Ansicht, daß ein Teil der Viridans-Stämme SCHOTTMÜLLERS dem *Str. salivarius*, der andere, geringere Teil dem *Str. faecalis* zuzurechnen sei. Auch spätere Untersucher teilten die Ansicht, daß die Kriterien SCHOTTMÜLLERS nicht für die exakte Bestimmung einer Art ausreichten. Praktisch führt das Studium der Arbeit ANDREWS' und HORTERS zu der Schlußfolgerung, daß *Str. viridans* (SCHOTTMÜLLER) und *Str. salivarius* identisch sind. Ihre biochemischen Untersuchungsergebnisse sind der beste Beweis dafür. Es ist auffällig, wie lange es gedauert hat, bis diese Erkenntnis in der Literatur ihren Niederschlag gefunden hat.

In BERGEY's Manual (2) (1934) sind z.B. unter der Sammelbezeichnung "Viridans-Gruppe" u.a. die Arten *Str. salivarius*, *Str. mitis* und *Str. mitior* (SCHOTTMÜLLER) noch nebeneinander aufgeführt. Erst 1939

erschieden hier *Str. salivarius* und *Str. mitior* (SCHOTTMÜLLER) als identisch, wobei *Str. salivarius* aus nomenklatorischen Gründen der Vorzug gegeben wurde. Der Begriff *Str. viridans* war inzwischen auf den Erreger der Endocarditis lenta beschränkt worden, wenngleich es nicht gelang, einen spezifischen Erreger der Endocarditis lenta herauszuarbeiten, da man feststellen mußte, daß zwischen den einzelnen Stämmen eine erhebliche Variationsbreite bestand.

SHERMAN, NIVEN und SMILEY (28) teilten 1943 die *Salivarius*-Gruppe auf Grund ihrer Untersuchungen mit synthetischen Nährböden neu ein und bezeichneten nun die Arten, die auf den Nährböden schleimige Kolonien bildeten, als *Str. salivarius*, die nichtschleimbildenden als *Str. mitis*. Sie setzten damit den *Str. mitis* an Stelle des *Str. salivarius* als Homologon für den *Str. viridans*.

Diese in BERGEY's Manual (1948) neu festgesetzten Namensbezeichnungen setzen sich in Deutschland nur langsam durch, da der Kliniker eben erst, teils widerstrebend, die Identität *Str. salivarius* = *Str. viridans* angenommen hat. Hier ist es vor allem SEELEMAN (27), der auf Grund eigener Untersuchungen, sowie der Untersuchungsergebnisse japanischer Autoren die neuen Bezeichnungen ablehnt.

Neben den vergrünenden Streptokokken findet man in der Mundhöhle Streptokokken der serologischen Gruppe A (*Str. pyogenes*) sowie der Gruppen C, D, F, H u.a., diese allerdings fast nur bei entzündlichen Prozessen der Mundschleimhaut, des Parodontiums und der Tonsillen. GUTHOFF (6) konnte durch die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden, besonders der Selenit-Indikator-Platte, herausarbeiten, daß das Gros der "Mundstreptokokken" sich in pathogenetisch

bedeutungslose und in Typen oder Arten mit pathogenen Eigenschaften weiter aufgliedert. Gerade den Streptokokken mit Gruppenantigenen werden heute vor allem von GUTHOFF pathogene Eigenschaften für chronische Prozesse an den Tonsillen und im periapikalen Gebiet der Zähne zugeschrieben.

Da die Streptokokken mit Gruppenantigenen in der gesunden Mundhöhle praktisch nicht vorkommen, wertet LAMMERS (16) ihr Auftreten als unphysiologisch. Diese "Dysbakterie" kann schon durch abnorme Milieuverhältnisse bedingt sein, wie z.B. Stellungsanomalien der Zähne, Zahnstein, Retentionsstellen usw. Selbst Raucherbeläge (nicht das Rauchen selbst) können die Ansiedlung fakultativ pathogener Streptokokken in der Mundhöhle begünstigen (25).

Hieraus ist ersichtlich, daß das bakteriologische Mundbild des einzelnen Menschen individuell geprägt ist und aus den Milieuverhältnissen resultiert, die von lokalen, endogenen und exogenen Faktoren abhängig sind. Es ist klar, daß sich deshalb verbindliche Angaben, etwa über den prozentualen Anteil eines dieser Keime an der Gesamtflora, wegen der Vielfalt der Milieuunterschiede nur bedingt machen lassen.

Teilt man die Bakterien der Mundhöhle nach ihrem Spaltungsvermögen ein, so gelangt man dabei zu zwei grossen Gruppen: den säurebildenden Bakterien und den Keimen mit starken proteolytischen Eigenschaften. Zu der letzten Gruppe gehören in der Hauptsache Coli-, Proteus- und Pyocyaneus-Bakterien, die aber bei Zufuhr von kohlehydratreicher Nahrung von den Säurebildnern völlig überwuchert werden. Für die Anfälligkeit für Karies sind unserer Ansicht nach weniger die proteolytischen als die glykolytischen Eigenschaften der Mundhöhlenflora wichtig.

Untersuchen wir einmal die in der Mundhöhle auftretenden Streptokokken nach ihrer Glykolyse und ihrer Fähigkeit, im sauren Milieu zusätzlich Gärungssäuren zu bilden, so ergibt sich folgendes Bild: fast sämtliche mit Vergrünung wachsenden Streptokokken vergären Kohlehydrate bis zu einem End-pH-Wert von 4,0. Eine Ausnahme stellt der *Str. viridans seu mitis* dar, dessen End-pH-Wert bei 4,2 liegt. Tabelle 1 gibt Aufschluß darüber, welche Zuckerarten von den wichtigsten mit Vergrünung wachsenden Streptokokken angegriffen werden.

Tabelle 1. Das Kohlehydrat-Spaltungsvermögen einiger Streptokokkenarten
(nach HALLMANN) (8)

	<i>Arabinose</i>	<i>Maltose</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Lactose</i>	<i>Trehalose</i>	<i>Raffinose</i>
<i>Str. salivarius</i>	-	+	+	(+)	(+)	+
<i>Str. mitis seu viridans</i>	-	+	+	+	(-)	(-)
<i>Str. bovis</i>	w	+	+	+	w	+
<i>Str. lactis</i>	w	+	w	+	+	(-)
<i>Str. faecalis</i>	w	+	w	+	+	w
<i>Str. liquefaciens</i>	w	+	(+)	+	+	w

Zeichenerklärung:

+ = positiv

- = negativ

w = wechselnd (je nach Typ)

() = positiv oder negativ mit seltenen Ausnahmen

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß eine gemischte Streptokokkenflora in der Lage ist, praktisch alle mit der Nahrung zugeführten Kohlehydrate zu vergären.

Im Gegensatz zu diesen starken glykolytischen Eigenschaften weisen die mit Vergrünung wachsenden Streptokokken fast keine proteolytischen Fähigkeiten auf. Eine Ausnahme bildet hier der Str. liquefaciens, der zur Enterokokken-Gruppe gehört.

Im Hinblick auf die Kariesanfälligkeit spielen die Säuremenge und die pH-Verschiebung am Zahn eine wichtige Rolle. Während wir festgestellt hatten, daß eine gemischte Streptokokkenflora praktisch sämtliche Kohlehydrate der Nahrung vergären kann, ist die Intensität der Vergärung eine Frage des zahlenmässigen Vorkommens der Streptokokken, denn Kohlehydrate werden umso rascher zu Gärungssäuren abgebaut, je grösser die Anfangskeimzahl ist.

Da die Enterokokken die einzige Gruppe der mit Vergrünung wachsenden Streptokokken bilden, denen deutliche proteolytische Eigenschaften zukommen, bestimmten wir bei unseren Untersuchungen mit Rattenspeichel sowohl die Keimzahl glykolytischer Streptokokken als auch die der proteolytisch wirkenden Enterokokken.

III. Die Speichelflora bei der experimentellen Tierzahnkaries

Schon verschiedene Autoren haben versucht, bei Versuchstieren Zusammenhänge zwischen der Zahnkaries und der Speichelflora offenzulegen. Im Vordergrund standen dabei meist Untersuchungen über die säure-toleranten Milchsäurestäbchen (Lactobazillen).

JAY (9) fand bei 11 erwachsenen und 25 drei Wochen alten, kariesanfälligen Ratten bedeutend mehr Lactobazillen (bis zu 35000 pro ml) als bei der gleichen Anzahl kariesresistenter Ratten (bis zu 2000 pro ml).

ORLAND und REYNIERS (21) infizierten keimfrei aufgezogene Ratten mit Enterokokken und konnten daraufhin die Entstehung kariöser Läsionen an den Molaren der Tiere beobachten.

ORLAND (22) untersuchte die Speichelflora von 179 syrischen Hamstern, die mit verschiedenartiger Kost aufgezogen wurden, und konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Lactobazillen und Streptokokken des Speichels und der Kariesaktivität feststellen.

ROSEN, BENARDE, HUNT und HOPPERT (24) untersuchten die Abhängigkeit der Lactobazillen-Zahlen vom Lebensalter bei kariesresistenten und kariesanfälligen Ratten. Sie stellten ein leichtes Ansteigen der AcB-Zahlen parallel zu der Ausbildung kariöser Läsionen fest, während sie bei den kariesresistenten Tieren eine mit zunehmendem Lebensalter geringer werdende Zahl von Lactobazillen fanden.

Die gleichen Autoren untersuchten auch die Streptokokkenflora des Rattenspeichels bei kariesanfälligen

und kariesresistenten Tieren. Als Nährboden benutzten sie neben anderen den "Mitis-Salivarius-Agar" nach CHAPMAN, auf dem sie am deutlichsten die Unterschiede innerhalb der Streptokokkenflora feststellen konnten. Sie fanden in der Hauptsache zwei Arten von Streptokokken: solche, die glatte, "Gummitropfen"-ähnliche Kolonien bildeten, und die sie als *Str. salivarius* identifizierten, und solche, die rauhe, kraterförmige Kolonien bildeten. Die letzteren konnten sie zu keiner der in BERGEY's Manual angegebenen Arten zuordnen. Sie vermuteten, daß es sich dabei um eine Variante des *Str. salivarius* handelte. Als Ergebnis ihrer Untersuchungen fanden sie, daß die rauhen, kraterförmigen Kolonien bei allen kariesresistenten Tieren, aber bei nur 18 % der kariesanfälligen Ratten auftraten. Die Kolonien des *Str. salivarius* fanden sich bei 96 % der kariesanfälligen Tiere und bei 47 % der resistenten Tiere.

Um nun die Streptokokken im Hinblick auf die Karies beurteilen zu können, mußte zunächst einmal durch langfristige Untersuchungen eruiert werden, wie sich die Streptokokkenflora des Rattenspeichels zusammensetzt. So war zu klären, ob bei der Ratte nicht andere Streptokokkenarten als beim Menschen auftreten, oder ob etwa durch Verunreinigungen genaue Ergebnisse verhindert werden. Dies festzustellen, war das Ziel unserer Untersuchungen, wobei wir moderne Tests mit einbezogen.

IV. Eigene Untersuchungen über die Streptokokkenflora des Rattenspeichels

1. Untersuchungsmethodik

Durch langfristige Untersuchungen an weissen Ratten (*rattus norvegicus albinus*) sollte die Streptokokkenflora des Rattenspeichels quantitativ und qualitativ erfaßt werden.

a) Tiermaterial

Als Versuchstiere wählten wir aus dem Tierstall der Universitäts-Zahnklinik 10 weisse Ratten aus. Wir untersuchten den Speichel dieser Tiere und den ihrer Nachkommen über 2 weitere Generationen. Die Speichelauswertungen wurden in bestimmten Abständen durchgeführt und erstreckten sich über einen Zeitraum von einem Jahr.

b) Speichelentnahme

Die geringe Speichelsekretion der Ratte macht es unmöglich, eine meßbare Menge von Speichel zu gewinnen. Wir mußten daher versuchen, mit Hilfe eines sterilen Diphtherie-Tupfers eine unbestimmte Menge Speichels aus der Rattenschnauze zu entnehmen. Dabei gingen wir folgendermassen vor: ein Kollege hielt die Ratte mit der rechten Hand dicht hinter dem Kopf am Nackenfell fest, während er gleichzeitig mit der linken Hand die Kiefer des Tieres mit Hilfe einer sterilen, anatomischen Pinzette sperrte. Der Tupfer, der vorher mit einer sterilen, 1 %igen Dextrose-Bouillon (pH 6,4) angefeuchtet worden war, wurde nun vorsichtig in die Mundhöhle des Tieres eingeführt, wobei streng darauf geachtet wurde, daß der Wattetupfer nicht durch Abwehrbewegungen der Ratte

mit den Vorderfüssen oder der äusseren Schnauze in Berührung kam. Nun strichen wir mit dem Tupfer mehrmals in saggitaler und transversaler Richtung über die Molaren des Unterkiefers, und zwar aus praktischen Gründen über die der rechten Seite.

Hierbei war das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Tiere auffällig. Während die meisten Tiere sich ohne weiteres anfassen liessen, sträubten sich einige derart heftig, daß es nur unter grossen Schwierigkeiten möglich war, das Tier zu fassen und die Speichelprobe zu entnehmen. Auch die Nachkommen dieser Tiere zeigten das gleiche Verhalten.

Der Tupfer mit dem anhaftenden Speichel wurde anschließend sofort in 10 ml 1 %iger, steriler Traubenzucker-Bouillon ausgeknetet. Die Verarbeitung der infizierten Bouillon auf Nährböden erfolgte innerhalb einer Stunde nach Entnahme der Speichelprobe.

c) Nährböden

Zur Bestimmung der Streptokokkenflora benutzten wir den von CHAPMAN (3) angegebenen Mitis-Salivarius-Agar, weil bei diesem Nährboden die Unterschiede zwischen *Str. mitis*, *Str. salivarius* und Enterokokken, als den Hauptvertretern der Streptokokkenflora des Rattenspeichels, am deutlichsten zu sehen sind. So bildet der *Str. salivarius* hellblaue, grosse Kolonien, die meist eine glatte, mitunter auch rauhe Oberfläche haben. Der *Str. mitis* bildet kleine, blaue Kolonien von ungefähr 0,2 mm Durchmesser, während Enterokokken dunkelblaue bis schwarze, glatte Kolonien von unterschiedlicher Grösse bilden. Mit Ausnahme von einigen coliformen Bakterien, die in gelegentlichen Fällen grosse, dunkelbraune Kolonien bilden, wachsen auf diesem Medium keine anderen Bak-

terienarten. Der Mitis-Salivarius-Agar nach CHAPMAN setzt sich wie folgt zusammen:

Bacto-Tryptose	10 g
Proteose Peptone	5 g
Proteose Peptone Nr. 3 Difco	5 g
Bacto-Dextrose	1 g
Saccharose	50 g
Dipotassium Phosphate	4 g
Trypan-Blue	0,075 g
Bacto-Crystal-Violet	0,0008 g
Bacto-Agar	15 g

Die Herstellung der Nährbodenplatten wurde nach Angabe der Hersteller-Firma wie folgt vorgenommen: 90 g des dehydrierten Nährbodens wurden in 1000 ml kaltes Wasser gegeben und bis zum Kochen erhitzt, um die einzelnen Bestandteile vollständig zu lösen. Diese Lösung wurde dann bei 121° 15 Minuten lang im Autoklaven sterilisiert. Nachdem die Lösung auf etwa 50 - 55° abgekühlt war, wurde 1 ccm CHAPMAN-Tellurit-Lösung zugegeben. Dann wurde der flüssige Nährboden in sterile Petrischalen von 95 mm Durchmesser gegossen und erstarren gelassen.

Da wir, wie oben erwähnt, keine bestimmte Menge Speichel zur Verfügung hatten, mußten wir ein System finden, zu dem wir die Zahl der auf CHAPMAN-Agar gewachsenen Kolonien in Beziehung setzen konnten. Wir wählten dafür einen gewöhnlichen Nähragar mit einem pH-Wert von 7,4, auf dem wir die Gesamtzahl der in der Speichelprobe enthaltenen Keime bestimmten.

Um daneben einen Anhaltspunkt für die gesamte säurebildende Flora des Rattenspeichels zu bekommen, beimpften wir gleichzeitig SNYDER-Test-Röhrchen mit

der infizierten Bouillon. Der SNYDER-Test-Agar hat nach LAMMERS und HAFER (14) folgende Zusammensetzung:

Bacto-Trypton	20 g
Dextrose	20 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	20 g
Bromkresolgrün	0,02 g

Das Prinzip des SNYDER-Tests (29) beruht auf der Tatsache, daß bestimmte Indikatorstoffe (hier Bromkresolgrün) mit steigender Wasserstoffionen-Konzentration ihre Farbe verändern. Der Farbumschlag eines beimpften SNYDER-Tests von Blaugrün nach Gelb läßt damit Schlüsse zu auf das zahlenmässige Vorhandensein säurebildender Bakterien. Der geringe Aufwand an Arbeit und Material machen den SNYDER-Test zu einem bedeutenden Hilfsmittel zur raschen Beurteilung der säurebildenden Speichelflora. Außerdem gibt uns der SNYDER-Test in Verbindung mit dem SL-Test nach ROGOSA, MITCHELL und WISEMAN (23) die Möglichkeit, Reihenuntersuchungen über die Kariesdisposition ohne den seither notwendigen großen Aufwand an Zeit und Material durchzuführen.

d) Verarbeitung der Zahnabstriche

In einer Reihe von Vorversuchen ermittelten wir die für unsere Versuchsanordnung günstigste Verdünnung der infizierten Nährbouillon. In sterilen Penicillin-Fläschchen mischten wir danach einen ml Bouillon mit 9 ml physiologischer Kochsalzlösung. Nun beimpften wir die Oberfläche einer Nähragar-Platte und einer CHAPMAN-Agar-Platte mit je 0,1 ml dieser Verdünnung.

Die SNYDER-Test-Röhrchen wurden im kochenden Wasserbad verflüssigt und nach Abkühlen auf 45° vermittels steriler Ampullen-Spritzen mit je 0,2 ml der verdünnten Bouillon beimpft. Durch 5 Minuten langes Rollen der Röhrchen zwischen den Händen, sorgten wir für eine innige Vermischung der Impfprobe mit dem flüssigen Nährboden. Bei Zimmertemperatur liessen wir die Nährböden erstarren und stellten sie dann in den Brutschrank, wo sie bei 37° zusammen mit den Nähragar- und CHAPMAN-Agar-Platten bebrütet wurden. Die Auswertung der Nährbodenplatten erfolgte nach 48 Stunden, wobei zu bemerken ist, daß bei den CHAPMAN-Platten zur besseren Differenzierung der einzelnen Kolonien mitunter eine Bebrütung von 72 Stunden notwendig war. Der Farbumschlag der Schnelltests wurde nach 24, 48 und 72 Stunden abgelesen. Farbänderungen von Grün nach Gelb wurden mit + bis +++ bezeichnet; keine oder nur ganz geringe Abweichungen von der ursprünglichen Farbe wurden mit e bzw. +- bewertet.

2. Untersuchungsergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse von je einem Tier der I., II und III. Generation wurden zu je einer Versuchsreihe zusammengefaßt.

Die Streptokokkenflora des Rattenspeichels charakterisiert sich in den Ergebnissen, die wir mit Hilfe des CHAPMAN-Agars gewinnen konnten. Anhaltspunkte für die Keimzahl, die mit dem Tupferabstrich erfaßt wurde, lieferten uns die Ergebnisse, die wir mit Nähragar erzielten. Die festgestellten Keimarten und Keimzahlen haben wir zunächst einmal tabellarisch erfaßt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Zahl der auf CHAPMAN-Agar und auf gewöhnlichem Nähragar gewachsenen Keime aus Rattenspeichel (Versuchsreihe 1)

		Tag der Speichelentnahme										
		20.12.	3.1.	17.1.	31.1.	14.2.	28.2.	14.3.	28.3.	11.4.	25.4.	16.5.
Auf CHAPMAN-Agar gewachsene Kolonien vom Typ	A	4	1	9	3	0	0	0	0	0	0	0
	B	5	3	9	19	6	23	2	1	10	4	3
	C	256	181	73	230	72	265	135	310	131	96	53
Keimzahl auf Nähragar		1260	152	100	225	183	290	281	168	171	415	295
		6.6.	27.6.	10.7.	8.8.	29.8.	19.9.	10.10.	31.10.	21.11.	11.12.	29.12.
Auf CHAPMAN-Agar gewachsene Kolonien vom Typ	A	0	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	B	10	52	56	10	13	75	3	23	5	15	10
	C	112	305	310	106	271	920	21	294	305	271	129
Keimzahl auf Nähragar		145	1100	2210	310	580	1100	153	190	620	942	208

Zeichenerklärung:

- A = grosse, glatte oder rauhe Kolonien (Str. salivarius)
 B = schwarze Kolonien (Enterokokken)
 C = kleine, hellblaue Kolonien (Str. mitis)

Da diese absoluten Zahlen der gewachsenen Kolonien nicht auf eine bestimmte Speichelmenge bezogen werden konnten, haben wir die Keimzahlen des CHAPMAN-Agars mit den Keimzahlen des Nähragars dadurch in Beziehung zueinander gesetzt, daß wir die Zahl der auf Nähragar gewachsenen Kolonien gleich 10 setzten. Dieser hypothetische Keim-Index der Versuchsreihe 1 ergibt bei graphischer Darstellung das in Abbildung 1a dargestellte Bild.

Aus der Abb. 1a geht hervor, daß die Streptokokkenflora des Rattenspeichels sowohl aus vergrünenden Streptokokken als auch aus Enterokokken zusammengesetzt ist. Die Keimzahl der Enterokokken lag über den gesamten Beobachtungs-Zeitraum etwa um

eine Zehnerpotenz niedriger als die der vergrünenden Streptokokken. Nicht nur die ermittelte Keimzahl des Rattenspeichels war erheblichen Schwankungen unterworfen (vergl. Tabelle 2), sondern auch der hypothetische Anteil der Streptokokken an der Speichelflora unterlag ständigen Schwankungen (vergl. Abb. 1a). Dennoch blieb das Verhältnis von vergrünenden Streptokokken zu Enterokokken in dieser Versuchsreihe mit wenigen Ausnahmen annähernd konstant. Deutliche Unterschiede der Streptokokkenflora zwischen jüngeren und älteren Tieren, sowie zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurden nicht beobachtet, sodaß sich eine Aufgliederung unserer Befunde nach Alter und Geschlecht erübrigte.

Prüfen wir nun, inwieweit diese Aussagen von den Ergebnissen der weiteren Versuchsreihen bestätigt oder verneint werden, so müssen wir die in den anderen Versuchsreihen ermittelten Ergebnisse mit denen der Versuchsreihe 1 vergleichen.

Die Ergebnisse bei der Versuchsreihe 2 verlaufen nicht so gleichmässig wie bei Versuchsreihe 1. So liegt der hypothetische Enterokokken-Anteil bei mehreren Auswertungen weit über dem hypothetischen Streptokokken-Index, während in zwei Fällen überhaupt keine Enterokokken gefunden wurden (Abb. 1b).

Noch extremer ist das Bild in der Versuchsreihe 3. Hier liegen die meisten Enterokokken-Werte weit über den Streptokokken-Werten (Abb. 1c).

Bei der Versuchsreihe 4 fallen vor allem zwei extrem hohe Enterokokken-Werte auf, während die anderen Werte in etwa denen der Versuchsreihe 1 entsprechen (Abb. 1d).

Die Ergebnisse der beiden ersten Generationen der Versuchsreihe 5 entsprechen wieder annähernd dem aus Versuchsreihe 1 bekannten Bild, während in der III.

Generation wieder einige hypothetische Enterokokken-Anteile weit über den entsprechenden Streptokokken-Werten liegen (Abb. 1e).

In der Versuchsreihe 6 liegen zu Beginn der I. Generation die ermittelten Werte etwa auf gleichem Niveau mit denen der Versuchsreihe 1. Gegen Ende der I. Generation erscheint ein extrem hoher Enterokokken-Wert, dem in der II. und III. Generation ähnlich hohe Werte folgen. Auffallend ist hier ein hoher Streptokokken-Wert von über 40 in der III. Generation (Abb. 1f).

Sehr wechselhaft erscheinen die Werte im graphischen Bild bei Versuchsreihe 7. Besonders in der II. und III. Generation erscheinen wieder sehr hohe Enterokokken-Werte, während in der III. Generation ein extrem hoher Streptokokken-Wert auftritt (Abb. 1g).

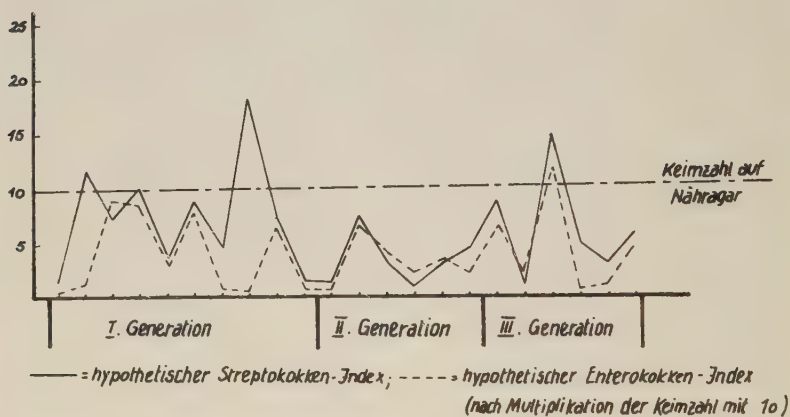
Gleichmässiger verlaufen die Index-Kurven bei Versuchsreihe 8 in der I. und II. Generation. Nur zu Ende der II. und III. Generation treten wieder sehr hohe Enterokokken-Zahlen auf, zu denen ein ganz extrem hoher Streptokokken-Wert am Ende der III. Generation kommt (Abb. 1h).

Bei Versuchsreihe 9 liegen Streptokokken- und Enterokokken-Werte wieder ziemlich dicht beieinander. Lediglich in der III. Generation tritt ein ungewöhnlich hoher Enterokokken-Anteil in Erscheinung (Abb. 1i).

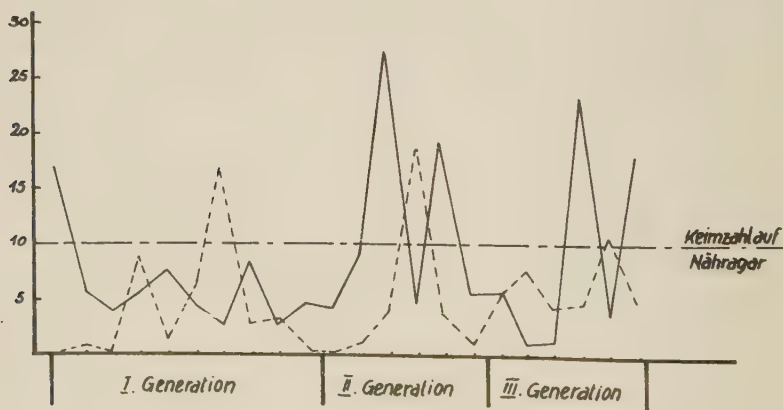
In allen Generationen der Versuchsreihe 10 treten wiederum außergewöhnlich hohe Enterokokken-Werte auf, während die dazwischen liegenden Werte denen der Versuchsreihe 1 nahekommen (Abb. 1k).

Abb. 1. Graphische Darstellung des Verhältnisses der auf CHAPMAN-Agar gewachsenen vergrünenden Streptokokken und Enterokokken zur Zahl der auf normalem Nähragar gewachsenen Kolonien. (Zahl der auf üblichem Nähragar gewachsenen Kolonien = 10).

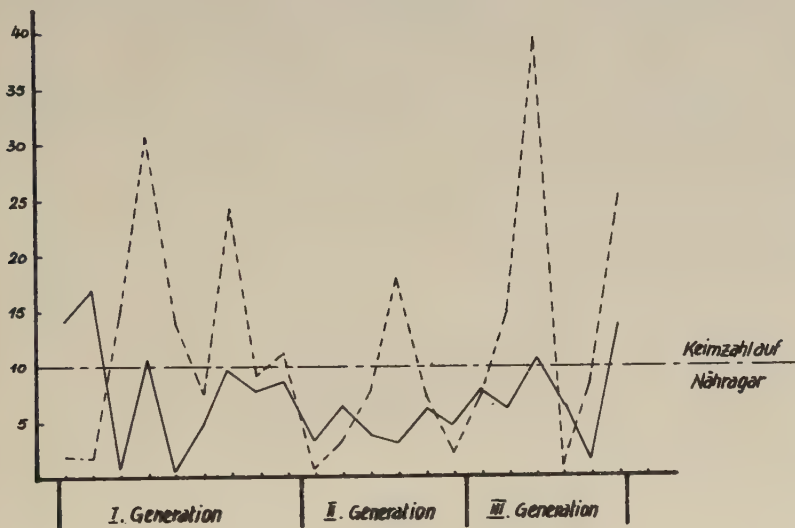
a) Ergebnisse der Versuchsreihe 1



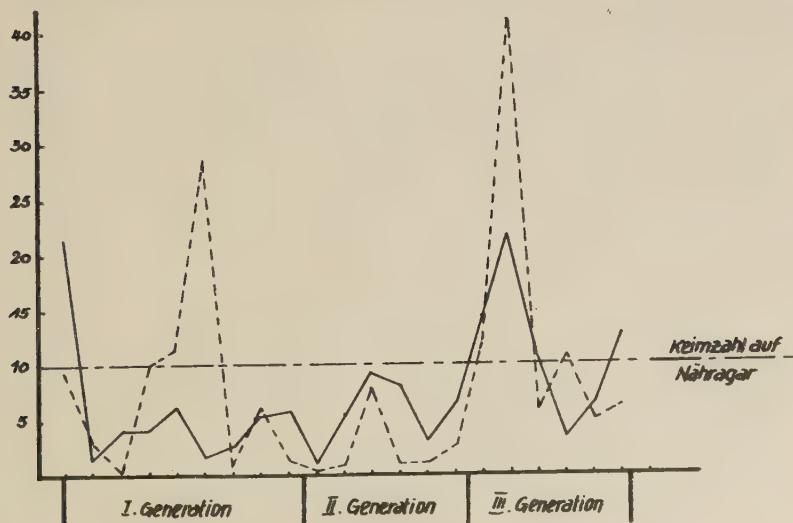
b) Ergebnisse der Versuchsreihe 2



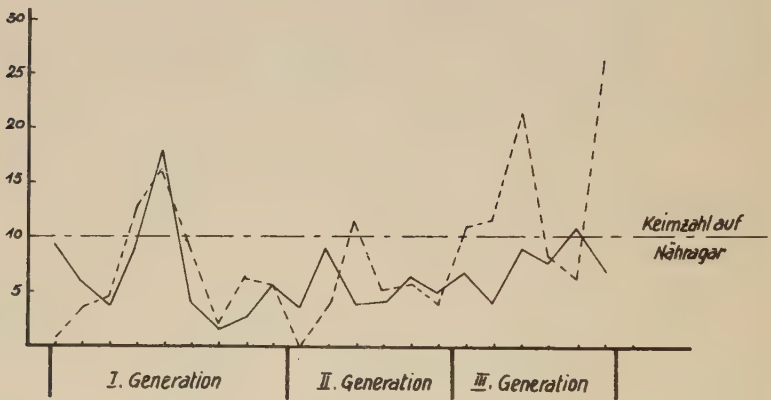
c) Ergebnisse der Versuchsreihe 3



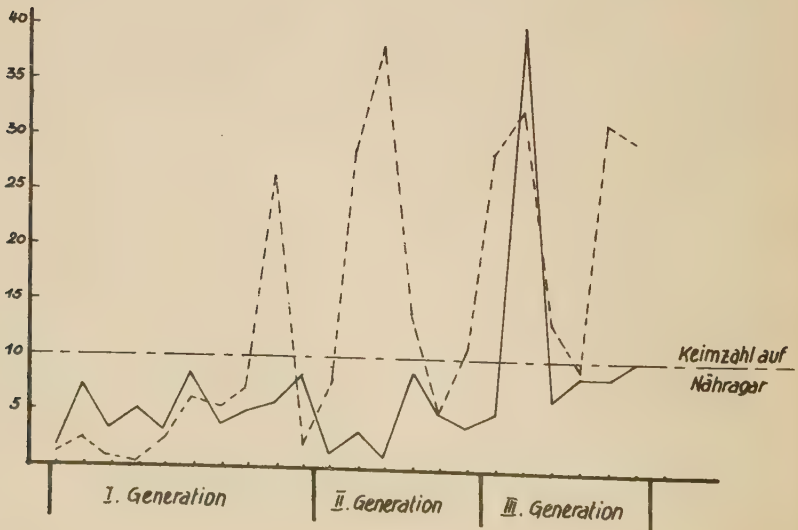
d) Ergebnisse der Versuchsreihe 4



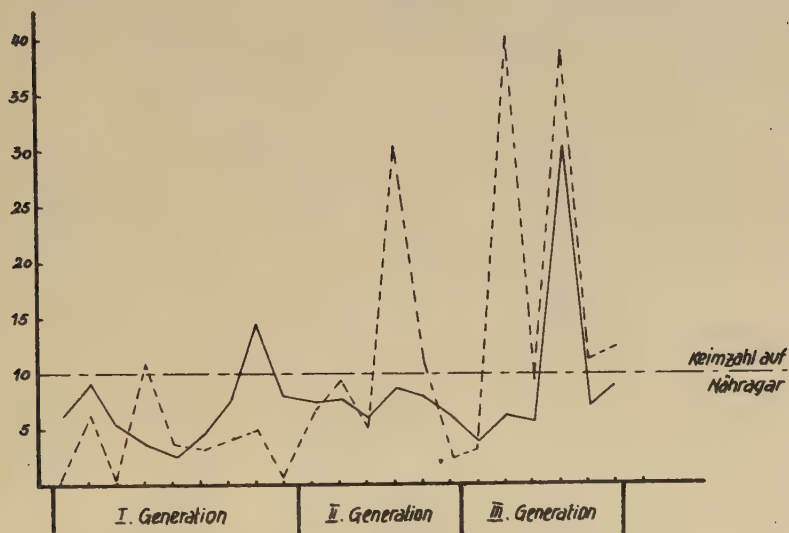
e) Ergebnisse der Versuchsreihe 5



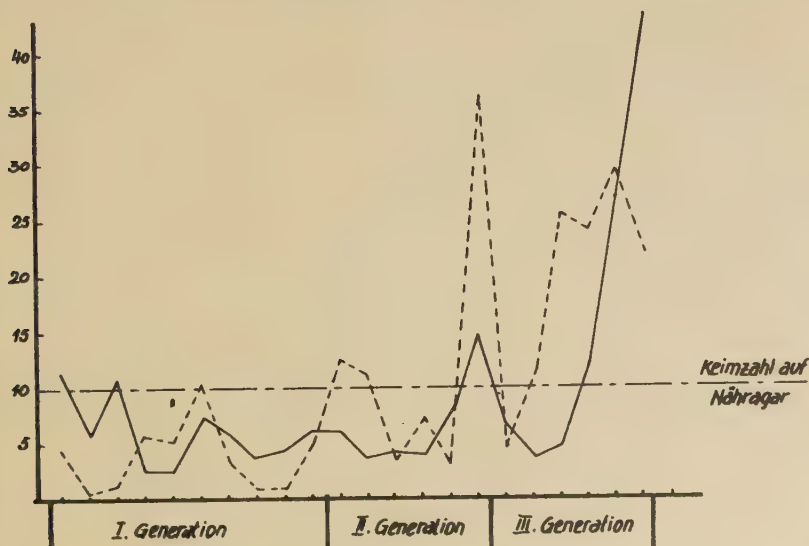
f) Ergebnisse der Versuchsreihe 6



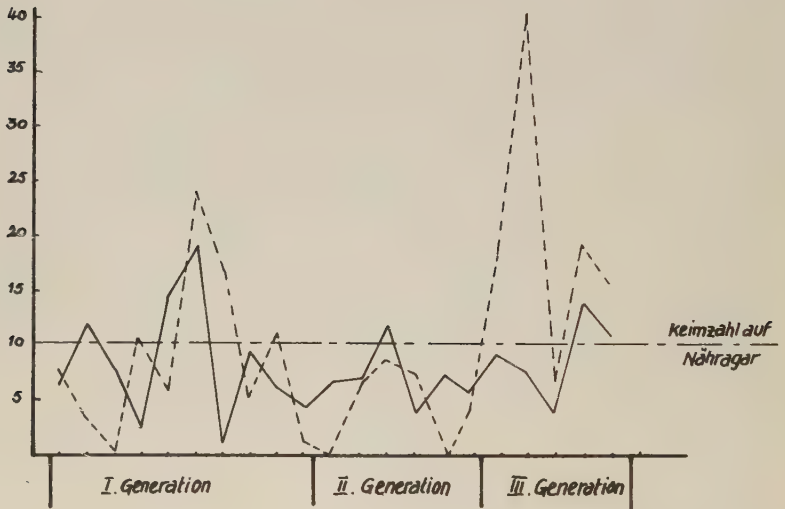
g) Ergebnisse der Versuchsreihe 7



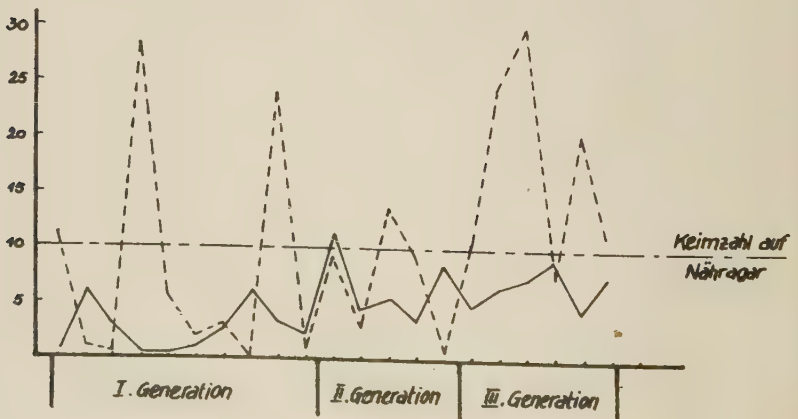
h) Ergebnisse der Versuchsreihe 8



i) Ergebnisse der Versuchsreihe 9



k) Ergebnisse der Versuchsreihe 10



Wir fanden also, daß die Streptokokkenflora des Rattenspeichels im Gegensatz zu der des menschlichen Speichels (30) einen erheblich höheren Anteil an Enterokokken aufweist. Somit ergab sich die Frage, ob der verhältnismässig hohe Gehalt des Rattenspeichels an Enterokokken sich auf die Ergebnisse der sogenannten Schnelltests auswirkt. Eine Beeinflussung war nur beim sogenannten SNYDER-Test zu erwarten, weil dieser zum Unterschied vom SL-Test, der nur auf Lactobazillen anspricht, die Streptokokkenflora mit erfaßt.

Die Ergebnisse des SNYDER-Tests sowie die Zahl aller auf CHAPMAN-Agar gewachsenen Streptokokken in den verschiedenen Versuchsreihen sind in der Abbildung 2 graphisch dargestellt.

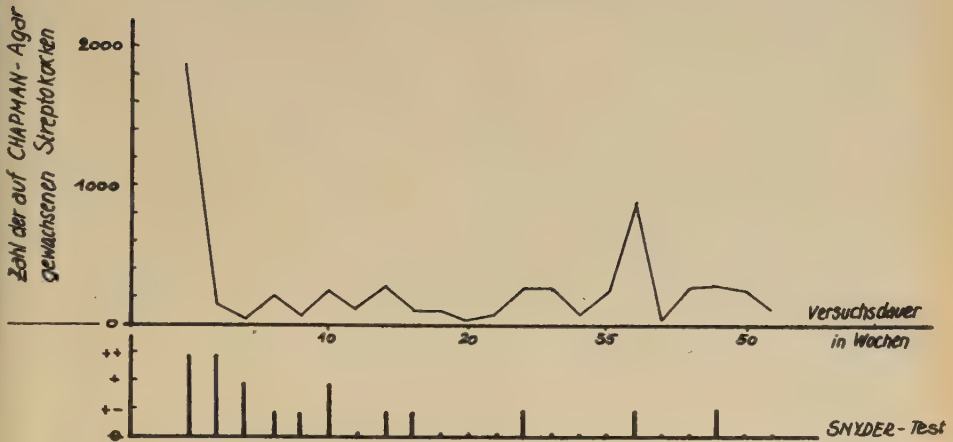
Überblicken wir unsere mit Hilfe des SNYDER-Tests gewonnenen Ergebnisse (Abb. 2, a-k), so fällt zunächst einmal auf, daß wir an unseren kariesfreien Tieren keinen stark positiven (+++) Ausfall des SNYDER-Tests beobachten konnten. Dennoch sahen wir positive Ergebnisse, die von schwach positiv (+-) bis deutlich positiv (++) wechselten. Häufig ist in den Ergebnissen des SNYDER-Tests eine Korrelation zu den Streptokokken-Keimzahlen sichtbar. Lag die Zahl der Streptokokken über 800, so war der Ausfall des entsprechenden SNYDER-Tests, mit einer Ausnahme (in der Versuchsreihe 7), stets positiv, während bei geringen Keimzahlen die Testergebnisse meist negativ waren. Dies zeigt sich besonders deutlich bei den Ergebnissen der Versuchsreihe 10 (Abb. 2k). Dennoch sind diese Aussagen nicht für alle Speichelauswertungen gültig. So beobachteten wir gelegentlich deutlich positive Ergebnisse des SNYDER-Tests

bei geringen Keimzahlen, z.B. in den Versuchsreihen 1, 2, 5, 7 und 9, aber auch negative Ausfälle des SNYDER-Tests bei relativ hohen Streptokokken-Zahlen. Beispiele hierfür finden sich in den Versuchsreihen 2, 5 und 9. Trotzdem können wir im grossen und ganzen eine Abhängigkeit des Ergebnisses des SNYDER-Tests von der Keimzahl der Streptokokken feststellen. Ein Einfluß von Geschlecht und Alter der Versuchstiere auf den Ausfall des SNYDER-Tests konnte dagegen nicht beobachtet werden.

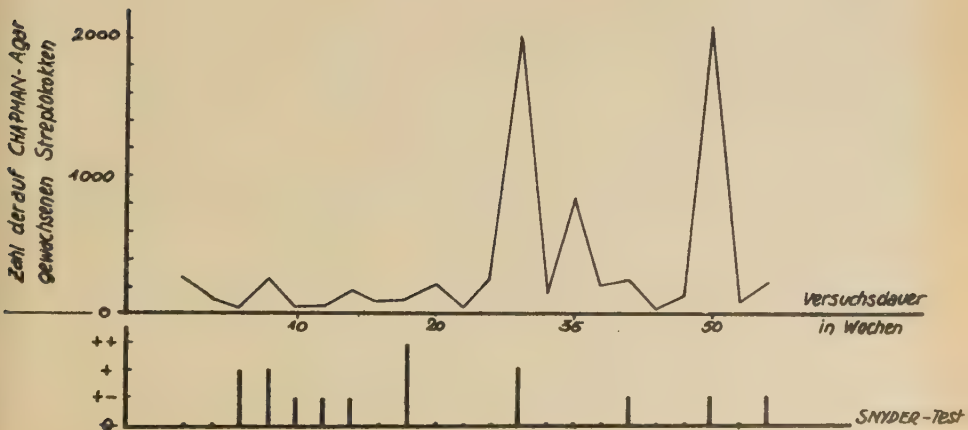
Diese Ergebnisse bedeuten, daß ebenso wie bei den SNYDER-Tests mit menschlichem Speichel, die Ergebnisse von der Keimzahl der Streptokokken überhaupt weitgehend bestimmt werden. Einen Einfluß der im Rattenspeichel häufiger vorkommenden Enterokokken auf unsere Testergebnisse konnten wir also nicht feststellen.

Abb. 2. Ergebnisse des SNYDER-Tests im Vergleich zur Zahl der auf CHAPMAN-Agar gewachsenen Streptokokken-Kolonien

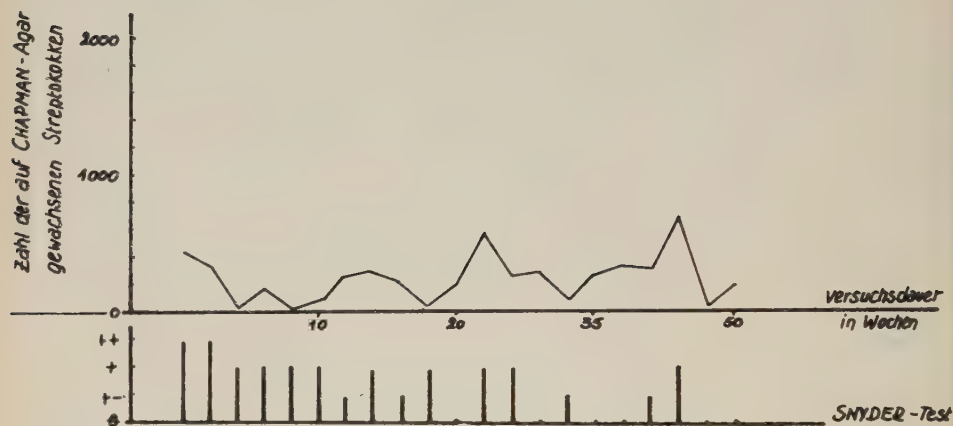
a) Ergebnisse der Versuchsreihe 1



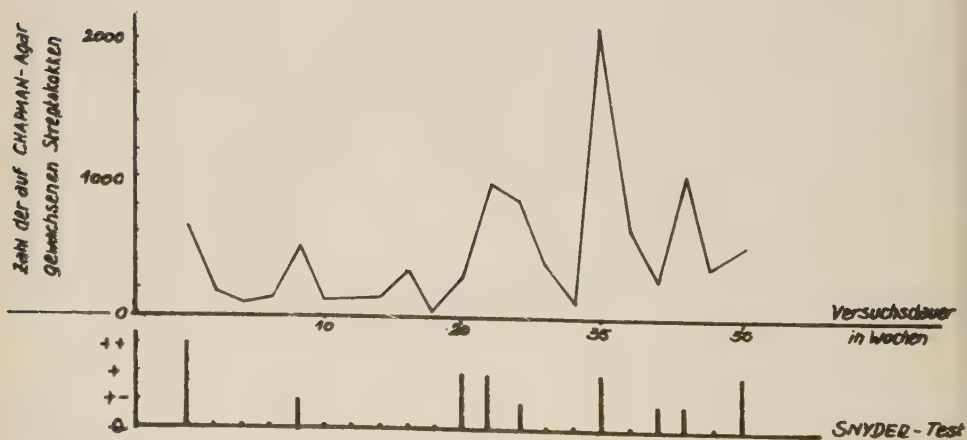
b) Ergebnisse der Versuchsreihe 2



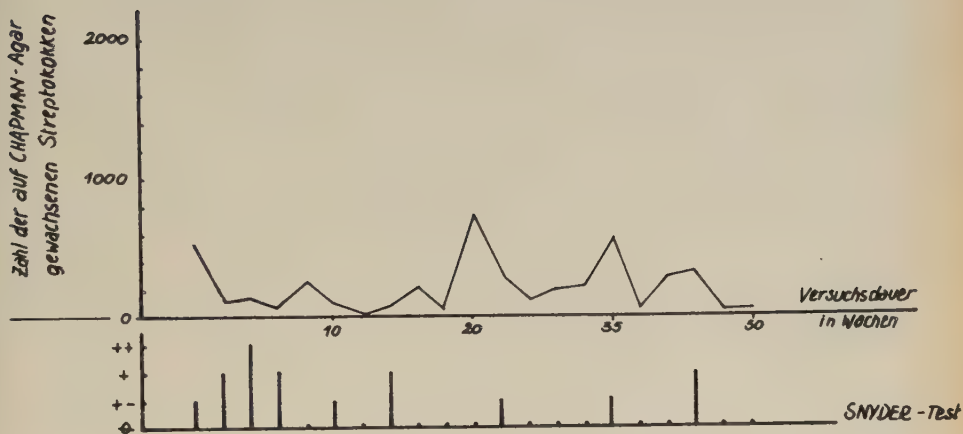
c) Ergebnisse der Versuchsreihe 3



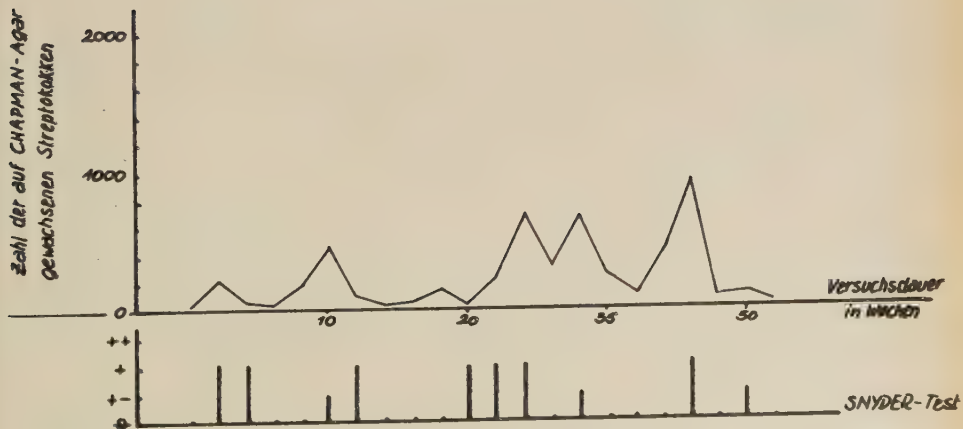
d) Ergebnisse der Versuchsreihe 4



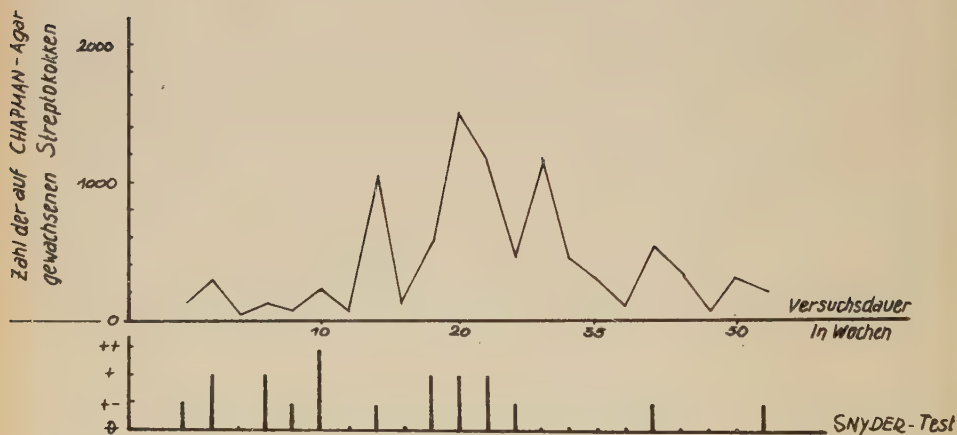
e) Ergebnisse der Versuchsreihe 5



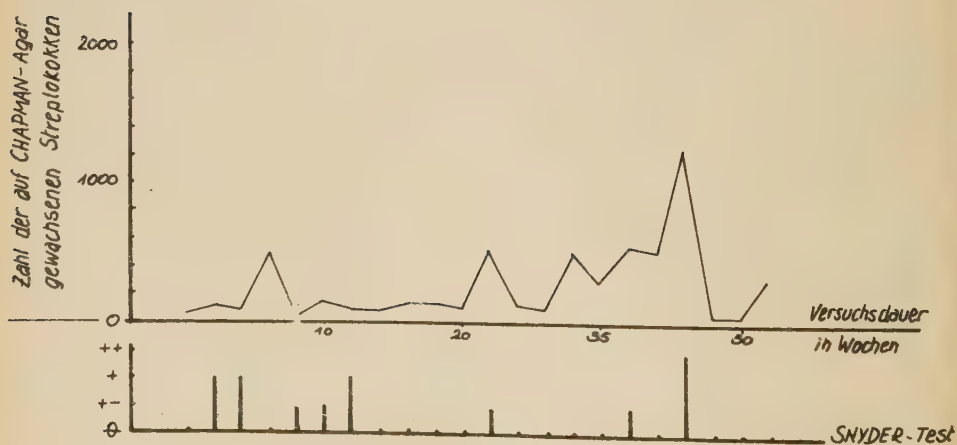
f) Ergebnisse der Versuchsreihe 6



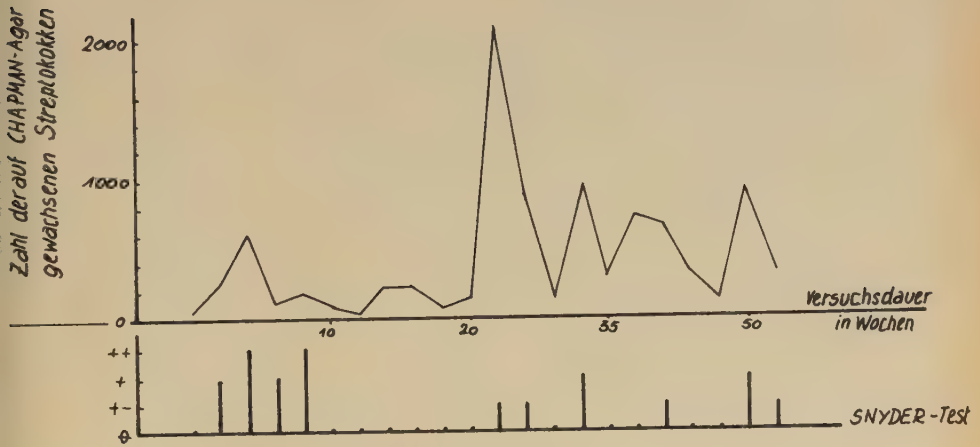
g) Ergebnisse der Versuchsreihe 7



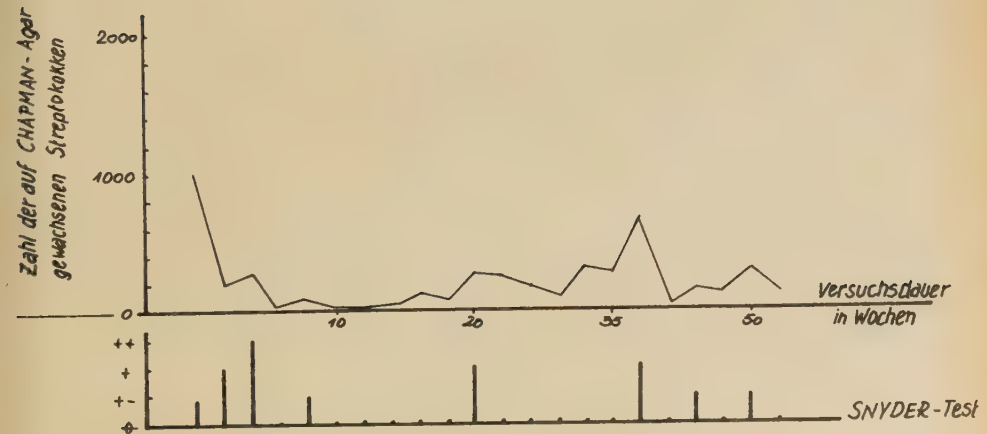
h) Ergebnisse der Versuchsreihe 8



i) Ergebnisse der Versuchsreihe 9



k) Ergebnisse der Versuchsreihe 10



V. Diskussion

In der experimentellen Kariesforschung besitzen bakteriologische Speicheluntersuchungen eine ständig grösser werdende Bedeutung. Um die beim Menschen ermittelten Zusammenhänge zwischen Speichelflora und Kariesaktivität auf das Versuchstier übertragen zu können, mußten zunächst die bakteriologischen Speichelverhältnisse beim kariesfreien Tier über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Während DÖHN (4) sich mit den Milchsäurestäbchen des Rattenspeichels auseinandergesetzt hat, prüften wir in parallelen Untersuchungen die Streptokokkenflora des Rattenspeichels, weil letztere sich im Hinblick auf die Entstehung von Gärungssäuren aus Kohlehydraten den Lactobazillen symbiontisch zugesellt.

Im Gegensatz zum menschlichen Speichel wurde im Rattenspeichel ein höherer Gehalt an Enterokokken festgestellt. In der Mehrzahl der Auswertungen stand der Keimgehalt an Enterokokken in bestimmter Relation zur Keimzahl der vergrünenden Streptokokken. Der Anteil der Enterokokken an der Streptokokkenflora betrug im allgemeinen 10 %, d.h. daß auf 10 Streptokokken-Kolonien etwa eine Enterokokken-Kolonie kam. Dieses Gleichgewicht der Speichelkeime untereinander war allerdings in einzelnen Ergebnissen nicht sichtbar, und zwar lagen hier die Enterokokken-Zahlen abnorm hoch. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, daß das Versuchstier vor der Speichelentnahme Kot gefressen hatte, der bekanntlich massenhaft Enterokokken enthält. Eine Abhängigkeit der Streptokokken-Zahlen von Alter und Geschlecht konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse des SNYDER-Tests waren im grossen und ganzen von der Keimzahl des Zahnabstriches an Streptokokken abhängig. Je höher die Zahl der Streptokokken war, desto stärker war im allgemeinen der positive Ausfall dieses Tests. Eine Erklärung für einzelne von dieser Regel abweichende Testergebnisse könnte darin liegen, daß andere säurebildende Bakterien einen Farbumschlag des Test-Nährbodens bewirkten. Der höhere Gehalt des Rattenspeichels an Enterokokken hatte offensichtlich keinen Einfluß auf den Ausfall des SNYDER-Tests.

Unsere Untersuchungsergebnisse bedeuten für die experimentelle Kariesforschung am Versuchstier, daß es auch hier eine sog. normale Speichelflora gibt, bei der ein bestimmtes Gleichgewicht der Bakterien zueinander auch über einen längeren Beobachtungszeitraum besteht. Inwieweit dieses Gleichgewicht bei der Zahnkaries des Versuchstieres über einen längeren Zeitraum gestört wird, muß noch in weiteren Untersuchungen ermittelt werden.

VI. Zusammenfassung

Durch langfristige Untersuchungen über drei Rattengenerationen wurde die Streptokokkenflora des Rattenspeichels ausgewertet. Die Untersuchungen wurden an kariesfreien Tieren durchgeführt. Sie sollten die Grundlage für bakteriologische Speichelauswertungen bei der experimentellen Tierzahnkaries schaffen.

Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Keimverhältnissen des menschlichen Speichels bei Ratten vermehrt Enterokokken auftreten. In der Mehrzahl der Auswertungen wurde ein bestimmtes Verhältnis von Enterokokken zu vergrünenden Streptokokken beobachtet, woraus zu schliessen ist, daß auch bei der Ratte die Speichelkeime sich in einem bestimmten Gleichgewichtszustand zueinander befinden. Eine unterschiedliche Besiedlung des Speichels mit Streptokokken in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Tiere wurde nicht beobachtet.

Die Ergebnisse des SNYDER-Tests waren im grossen und ganzen vom Keimgehalt des Speichels an Streptokokken abhängig. Der höhere Anteil an Enterokokken wirkte sich auf die Ergebnisse des SNYDER-Tests nicht aus.

VII. Literaturangaben

- 1) ANDREWS u. HORTER Lancet 1906, II., 708
- 2) BERGEY's Manual of determ. Bact.
1934, 1939, 1948
- 3) CHAPMAN, G.H. J. of Bact. 48 : 113 (1944)
- 4) DÖHN, K. Med. Diss. Mainz (1959)
- 5) EGGERS LURA, H. Odont. Tidskr. 64 : 35 (1956)
- 6) GUTHOFF, O. Zbl. f. Bakt. 158 (1952)
- 7) HADLEY, F.P. J. Dent. Res. 13 : 415 (1933)
- 8) HALLMANN, L. Bakteriologie und Serologie
Stuttgart (1955)
- 9) JAY, P. J. Am. Dent. Ass. 37 : 416
(1948)
- 10) KLINGE, K. DZZ. 6 : 1068 (1951)
- 11) KRASSE, B. Odont. Revy 5 : 241 (1954)
- 12) KRASSE, B. Acta Odont. Scand. 12 : 157
(1954)
- 13) KRASSE, B. Odont. Revy 5 : 203 (1954)
- 14) LAMMERS, T. u. HAFFER, H. Biologie der Karies
Heidelberg (1956)
- 15) LAMMERS, T. D. ZMK. 18 : 9, 10, 11, 12
(1953)
- 16) LAMMERS, T. Ärztl. Praxis 9 : 1670 (1959)
- 17) MILLER, W.D. Die Mikroorganismen der Mund-
höhle Leipzig (1889)

- 18) MORRIS, E.O. Brit. Dent. J. 95 : 77 u. 259
(1953)
- 19) MORRIS, E.O. Brit. Dent. J. 96 : 95 u. 259
(1954)
- 20) MORRIS, E.O. Brit. Dent. J. 97 : 29 u. 283
(1954)
- 21) ORLAND u. REYNIERS zit. n.
PALMER, H.B., LAFFER, N.C. u. FABER, E.J.
J. Dent. Res. 34 : 876 (1955)
- 22) ORLAND, F.J. J. Dent. Res. 25 : 455 (1946)
- 23) ROGOSA, S., MITCHELL, J.A. u. WISEMAN, R.F.
J. Dent. Res. 30 : 682 (1951)
- 24) ROSEN, S., BENARDE, M.A., HUNT, H.R. u. HOPPERT, C.A.
J. Dent. Res. 34 : 115 (1955)
- 25) SASSLOW u. STREITFELD Am. J. Med. Sci. 237 : 754
(1959)
- 26) SCHOTTMÜLLER Münch. med. Wschr. 1903
8, 9 u. 909
- 27) SEELEMANN Biologie der Streptokokken
Nürnberg (1954)
- 28) SHERMAN, NIVEN u. SMILEY J. of Bact. 41 : 479 (1941)
J. Biol. Chem. 140 : 105 (1941)
- 29) SNYDER, M.L. J. Dent. Res. 19 : 349 (1940)
- 30) WILLIAMS, N.B., FORBES, M.A., BLAU, W. u. EICKENBERG, C.F.
J. Dent. Res. 29 : 563 (1950)
- 31) WILLIAMS, J.L. Dent.Cosmos 39 : 260 (1897)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. T. LAMMERS für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für seine wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Dr. M. HERRMANN für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ferner bin ich den BLENDAX-Werken in Mainz und insbesondere Frau H. HAFFER für die Bereitstellung eines Teiles der Nährböden zu grossem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 27. Juli 1931 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Wilhelm Schmahl und seiner Ehefrau Eva, geb. Sieben in Mainz geboren. Nach Besuch der Volksschule in Mainz-Bretzenheim trat ich 1941 in das Gymnasium am Kurfürstlichen Schloß in Mainz ein und legte dort im Jahre 1950 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1951 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Universität Mainz, wo ich am 24. 2. 1953 die zahnärztliche Vorprüfung und am 18. 9. 1956 das zahnärztliche Staatsexamen bestand.

